

# 不同分布区天麻的 AFLP 分析

关萍<sup>1</sup>, 石建明<sup>1</sup>, 陈放<sup>2</sup>

(<sup>1</sup>贵州大学生命科学学院, 贵阳 550025; <sup>2</sup>四川大学生命科学学院, 成都 610064)

**摘要:**从贵州、云南、四川、陕西和辽宁收集了 27 份天麻样品, 从 64 对 AFLP 选择性引物组合中筛选出 16 对组合, 对不同分布区天麻的遗传多样性进行分析。16 对引物共产生 548 条大小在 100 ~ 1500 bp 的谱带, 其中多态性带 428 条, 多态性比率 (PP) 达 78%, 说明不同分布区的天麻中存在一定的遗传多样性, 且 AFLP 可以有效地进行天麻遗传多样性的分析。遗传差异分析结果表明, 27 个样品的遗传距离在 0.593 ~ 0.0187, 平均为 0.2199, 表明不同分布区天麻个体间存在一定的遗传差异。5 个省份的样品中来自贵州的样品遗传差异相对较大, 表明贵州蕴藏着相对丰富的基因资源, 可以作为天麻遗传改良的重要种质资源。不同变型的 AFLP 分析结果显示, 3 种变型从分子上无明显差异, 说明天麻种内的变型仅仅是表型上的变异, 尚未在遗传上固定下来, 对天麻几个变型的划分是否成立还有待进一步研究。

**关键词:** AFLP; 天麻; 遗传多样性

## AFLP Analysis of *Gastrodia Elata B1* from Different Regions

GUAN Ping<sup>1</sup>, SHI Jian-ming<sup>1</sup>, CHEN Fang<sup>2</sup>

(<sup>1</sup> College of Life Science, Guizhou University, Guiyang 550025; <sup>2</sup> College of Science, Sichuan University, Chengdu 610064)

**Abstract:** Amplified fragment length polymorphism (AFLP) was used to evaluate the genetic diversity of 27 accessions of *Gastrodia elata B1* from 5 provinces of China. A Total of 548 bands ranging in size from 100 bp to 1500 bp was generated from 16 primer combinations screened from 64 primer combinations and 428 of these bands showed polymorphism. The polymorphic ratio (PP) is up to 78%. Results showed that some genetics diversity existed among *Gastrodia elata B1* accessions from the different regions and AFLP can be used to investigate effectively genetic diversity of *Gastrodia elata B1*. The analysis of genetic variation indicated that the genetic distance among 27 accessions ranged from 0.593 to 0.0187, with an average of 0.2199, which revealed some extend genetic diversity of *Gastrodia elata B1* from different sources. However the Genetic variance of *gastrodia elata B1* accessions from Guizhou was more evident than that from other areas, which indicated that there was abundant gene resource of *Gastrodia elata B1* in Guizhou province. Therefore, the accessions from Guizhou can become significant germplasm resources in the genetic improvement of *Gastrodia elata B1*. The investigation on different forms of *Gastrodia elata B1* from the same places using AFLP analysis illustrated that the variance of inter-specific level was morphologic variation. Whether the classification of *Gastrodia elata B1* forms was correct still needed farther investigation.

**Key words:** AFLP; *Gastrodia elata B1*; Genetic diversity

兰科植物天麻 (*Gastrodia elata B1*) 属真菌寄生营养性的寄生型植物, 无根和绿色叶片、种子无胚乳、胚为原胚, 具有独特的生物学特性<sup>[1-2]</sup>。主要分布于我国云南、四川、贵州、西北和东北等地, 在日

本、韩国也有广泛分布<sup>[3]</sup>。天麻是中国传统的名贵中药, 现代药理研究表明, 天麻具有益气、定惊、养肝、止晕、祛风湿、强筋骨等作用<sup>[4]</sup>。主治风湿腰痛、小儿惊厥、眩晕头痛等症<sup>[5]</sup>。

收稿日期: 2011-12-29 修回日期: 2011-04-24 网络出版日期:

URL:

作者简介: 关萍, 教授。研究方向: 植物分子生物学及结构植物学。E-mail: guanp508@163.com.cn

通信作者: 石建明, 副教授。研究方向: 植物学。E-mail: gp107d@yahoo.com.cn

由 Vos 等<sup>[6]</sup>发明的 AFLP (Amplified fragment length polymorphism) 分子标记技术可以在基因序列未知的情况下,利用少数几对引物对相关物种的多态性进行有效检测。与其他分子标记相比,AFLP 具有明显的优势,如丰富的多态性、共显性表达、不受环境影响、并且 DNA 用量少、灵敏度高、重复性好的特点。该技术一出,就被广泛应用于物种遗传多样性的研究。植物遗传多样性的研究工作,对植物资源的利用、保护及植物遗传改良有重要意义。

由于天麻野生资源日益匮乏及广泛的人工营养繁殖栽培,导致天麻种质资源和遗传多样性日益减少和退化。国内外有关天麻遗传多样性的研究仅有

零星报道,有学者用 AFLP 对天麻遗传变型和来源于贵州的野生天麻进行了初步分析<sup>[7-8]</sup>。迄今为止尚未见来源于不同省份天麻遗传多样性的研究报道。本研究利用 AFLP 标记对来源于不同省份的天麻进行遗传多样性分析,旨在揭示不同地理分布区天麻的遗传关系和遗传多样性,为改良天麻品种、合理保护天麻的种质资源提供理论依据。

## 1 材料与方法

### 1.1 植物材料

从贵州、四川、云南、陕西、辽宁 5 个省份的 17 个天麻分布区采集具有花芽的箭麻 (secondary tuber), 样品来源和编号见表 1。

表 1 27 个供试材料及来源

Table 1 List of 27 accessions used in this study and their sources

编号 Code	试材料 Background	性状 Characteristics		来源 Source
		花色 Color of flower	花茎色 Color of flower stem	
1	红天麻 ( <i>G. elata</i> B1. f. <i>elata</i> )	橙红色 salmon pink	红色 red	贵州道真 Daozhen Guizhou
2	乌天麻 ( <i>G. elata</i> B1. f. <i>glauca</i> . S. Chow)	深灰色 dark gray	灰黄色 yellow gray	贵州道真 Daozhen Guizhou
3	绿天麻 ( <i>G. elata</i> B1. f. <i>viridis</i> Makino)	绿色 green	绿色 green	贵州道真 Daozhen Guizhou
4	红天麻 ( <i>G. elata</i> B1. f. <i>elata</i> )	橙红色 salmon pink	红色 red	贵州大方 Dafang Guizhou
5	乌天麻 ( <i>G. elata</i> B1. f. <i>glauca</i> . S. Chow)	深灰色 dark gray	灰黄色 yellow gray	贵州大方 Dafang GuiZhou
6	绿天麻 ( <i>G. elata</i> B1. f. <i>viridis</i> Makino)	绿色 green	绿色 green	贵州大方 Dafang Guizhou
7	红天麻 ( <i>G. elata</i> B1. f. <i>elata</i> )	橙红色 salmon pink	红色 red	贵州雷公山 Leigong mountain Guizhou
8	红天麻 ( <i>G. elata</i> B1. f. <i>elata</i> )	橙红色 salmon pink	红色 red	贵州施秉 Shibing Guizhou
9	红天麻 ( <i>G. elata</i> B1. f. <i>elata</i> )	橙红色 salmon pink	红色 red	贵州毕节 Bijie Guizhou
10	绿天麻 ( <i>G. elata</i> B1. f. <i>viridis</i> Makino)	绿色 green	绿色 green	贵州梵净山 Fanjing mountain Guizhou
11	绿天麻 ( <i>G. elata</i> B1. f. <i>viridis</i> Makino)	绿色 green	绿色 green	贵州桐梓 Tongzi Guizhou
12	绿天麻 ( <i>G. elata</i> B1. f. <i>viridis</i> Makino)	绿色 green	绿色 green	贵州正安 Zhengnan Ghouzhou
13	红天麻 ( <i>G. elata</i> B1. f. <i>elata</i> )	橙红色 salmon pink	红色 red	贵州贵定 Guiding Guizhou
14	红天麻 ( <i>G. elata</i> B1. f. <i>elata</i> )	橙红色 salmon pink	红色 red	贵州绥阳 Suiyang Guizhou
15	红天麻 ( <i>G. elata</i> B1. f. <i>elata</i> )	橙红色 salmon pink	红色 red	贵州贵阳 Guiyang Guizhou
16	红天麻 ( <i>G. elata</i> B1. f. <i>elata</i> )	橙红色 salmon pink	红色 red	四川青川 Qinchuan Sichuan
17	红天麻 ( <i>G. elata</i> B1. f. <i>elata</i> )	橙红色 salmon pink	红色 red	四川万源 Wanyuan Sichuan
18	红天麻 ( <i>G. elata</i> B1. f. <i>elata</i> )	橙红色 salmon pink	红色 red	四川平武 Pingwu Sichuan
19	乌天麻 ( <i>G. elata</i> B1. f. <i>glauca</i> . S. Chow)	深灰色 dark gray	灰黄色 yellow gray	四川平武 Pingwu Sichuan
20	红天麻 ( <i>G. elata</i> B1. f. <i>elata</i> )	橙红色 salmon pink	红色 red	四川峨眉山 Emei mountain Sichuan
21	红天麻 ( <i>G. elata</i> B1. f. <i>elata</i> )	橙红色 salmon pink	红色 red	陕西巴山 Ba mountain Shanxi
22	红天麻 ( <i>G. elata</i> B1. f. <i>elata</i> )	橙红色 salmon pink	红色 red	陕西秦岭 Qinling mountain Shanxi
23	乌天麻 ( <i>G. elata</i> B1. f. <i>glauca</i> . S. Chow)	深灰色 dark gray	灰黄色 yellow gray	云南昭通 Zhaotong Yunnan
24	黄天麻 ( <i>G. elata</i> B1. f. <i>flavida</i> S. Chow)	黄色 yellow	黄红色 yellow	云南昭通 Zhaotong Yunnan
25	绿天麻 ( <i>G. elata</i> B1. f. <i>viridis</i> Makino)	绿色 green	绿色 green	云南昭通 Zhaotong Yunnan
26	绿天麻 ( <i>G. elata</i> B1. f. <i>viridis</i> Makino)	绿色 green	绿色 green	辽宁宽甸 Kuandian Liaoning
27	红天麻 ( <i>G. elata</i> B1. f. <i>elata</i> )	橙红色 salmon pink	红色 red	辽宁宽甸 Kuandian Liaoning

## 1.2 DNA 的提取

选用生长良好无病虫害感染的花茎提取 DNA, DNA 的提取方法用改进的 CTAB 法<sup>[9]</sup>。DNA 浓度和纯度用分光光度计检测, 波长 260 ~ 280 nm, OD 值在 1.8 ~ 1.9 之间, 表明所提的 DNA 纯度高, 可用于 AFLP 的操作。将 DNA 浓度稀释至 50 ng/ $\mu$ l, -20 °C 保存备用。

## 1.3 AFLP 分析<sup>[10]</sup>

**1.3.1 酶切与连接** 取 300 ng DNA 于 500  $\mu$ l 的小离心管中加入下列物质: 10  $\times$  buffer 5  $\mu$ l, 样品 DNA 模板 300 ng, EcoR I (20 U/ $\mu$ l) 0.5  $\mu$ l, Mse I (10 U/ $\mu$ l) 1  $\mu$ l, 100  $\times$  BSA 2.5  $\mu$ l, 双蒸水补足体积 50  $\mu$ l。将反应液混匀后置 37 °C 酶切 5 h, 然后 65 °C 温浴 10 min 钝化限制性内切酶; 在 41  $\mu$ l 酶切完成的 DNA 样品中加入 EcoR I 接头 (5  $\mu$ mol/L) 1.0  $\mu$ l, Mse I (5.0  $\mu$ mol/L) 1.0  $\mu$ l, T<sub>4</sub> DNA Ligase 2.0  $\mu$ l 混匀后于 16 °C 连接过夜。

**1.3.2 预扩增** 取 5.0  $\mu$ l 连接完成 DNA 样品加入 45  $\mu$ l 以下混合液: 10  $\times$  PCR buffer 5.0  $\mu$ l, dNTP (5 mmol/L) 4.0  $\mu$ l, MgCl<sub>2</sub> (25  $\mu$ mol/L) 3.0  $\mu$ l, Taq 酶 (5 U/ $\mu$ l) 0.5  $\mu$ l, EcoRI 预扩增引物 (10  $\mu$ mol/L) 2.0  $\mu$ l, MseI 预扩增引物 (10  $\mu$ mol/L) 2.0  $\mu$ l, 双蒸水补足体积到 50  $\mu$ l, 反应液混匀后进行扩增, 程序如下: 94 °C 2 min; 94 °C 30 s, 56 °C 30 s, 72 °C 1 min, 共 30 个循环; 72 °C 5 min; 4 °C 保存; 反应结束后取 5  $\mu$ l PCR 产物用 1% 的琼脂糖凝胶电泳检测预扩增效果。将预扩增产物稀释 10 倍置于 -20 °C 冰箱保存备用。

**1.3.3 选择性扩增** 选择性扩增引物的选择性碱基采用 3 + 3 引物组合。选择性扩增反应体系如下: 10  $\times$  PCR buffer 2.5  $\mu$ l, dNTP (5 mmol/L) 2.0  $\mu$ l, MgCl<sub>2</sub> (25 mmol/L) 1.5  $\mu$ l, Taq 酶 (5 U/ $\mu$ l) 0.2  $\mu$ l, EcoR I 选择性扩增引物 (10  $\mu$ mol/L) 1.0  $\mu$ l, Mse I 选择性扩增引物 (10  $\mu$ mol/L) 1.0  $\mu$ l, 稀释 10 倍预扩增产物 2  $\mu$ l, 双蒸水补足体积到 25  $\mu$ l。扩增程序如下: 94 °C 2 min; 94 °C 30 s, 65 °C 30 s, 72 °C 1 min, 梯度降温, 每个循环降低 0.7 °C, 共 12 个循环; 94 °C 30 s, 56 °C 30 s, 72 °C 1 min, 共 30 个循环; 72 °C 5 min; 4 °C 保存; 反应结束后取 5  $\mu$ l 用 1% 的琼脂糖凝胶电泳检测扩增效果, 将选择性扩增产物置于 -20 °C 冰箱保存备用。

**1.3.4 聚丙烯酰胺凝胶电泳和银染** 取 4 ~ 5  $\mu$ l 扩增产物加入等体积的上样缓冲液 (98% 甲酰胺, 10 mmol/L EDTA, 0.75% 溴酚兰, 0.25% 二甲苯青)

混匀, 95 °C 变性 5 min 后立即在冰上冷却待用。在 6% 的 PAGE 胶上样孔中点 8  $\mu$ l, 恒功率 70 W, 电泳 1.5 h 左右, 直至二甲苯青带至板的 2/3 终止电泳, 取下玻璃板迅速固定、银染。

## 1.4 数据统计分析

为了分析遗传多样性, 将出现的带记为 1, 无带记为 0, 把原始数据输入计算机获得矩阵, 在 NTSYS2.10 软件上计算 Nei-Li 相似性系数<sup>[11]</sup>, 样品间的遗传距离 (GD) 用公式计算:  $GD = 1 - 2N_{ij} / (N_i + N_j)$ 。N<sub>ij</sub> 代表样品 i 和样品 j 共有的带, N<sub>i</sub> 和 N<sub>j</sub> 分别代表样品 i 和样品 j 特有的带。采用 UPGMA (Unweighted Pair-group Method With The Arithmetic Averages) 方法进行聚类分析。将各样品组合间的直线地理距离组成地理矩阵, 对样品组合的遗传距离和地理距离进行 Mantel 检测。

## 2 结果与分析

### 2.1 样品 AFLP 多态性及扩增效率

从 64 对 AFLP 引物组合中筛选出 16 对能产生信号强度一致、条带分布均匀、清晰的多态性引物, 16 对引物共产生 548 条大小在 100 ~ 1500 bp 的谱带 (表 2)。其中多态性带 428 条, 多态性比率 (PP) 78%, 平均每对引物产生 34 条条带。引物组合 1 号、6 号、23 号、44 号、59 号和 62 号的多态性都在 80% 以上, 1 号引物组合的多态性检出率最高达 93.4%, 26 号引物组合的多态性比率最低为 46.6%。显然, 16 对引物中的绝大部分都能作为不同分布区天麻的分子指纹图谱, 并用于遗传多样性分析。图 1 显示了不同分布区天麻及不同天麻变型的多态性 AFLP 图谱, 几乎所有不同来源和变型的 27 个样品都能被有效区分, 这说明不同分布区天麻中具有一定的遗传多样性, 且 AFLP 可以有效地用于天麻的遗传多样性分析并具有较高的多态性和可重复性。

### 2.2 遗传差异分析

表 3 显示了 27 个样品的遗传距离。遗传距离的计算结果表明, 27 个样品的遗传距离在 0.5930 ~ 0.0187, 平均为 0.2199。说明不同分布区天麻个体间存在一定的遗传差异。遗传差异最大的是大方样品 (6 号) 与施秉样品 (8 号) 之间为 0.593, 而遗传差异最小的是来自陕西的两个样品 (21 号、22 号) 之间为 0.0187。对不同省区样品的遗传差异的分析结果表明, 来自贵州的样品表现较大差异,

表 2 AFLP 引物组合及产生的多态性条带

Table 2 AFLP primer combinations and the polymorphic bands generated by selective amplification

引物 Primer combination	每条引物的条带数 Total No. of each primer	多态性带数 No. of polymorphic bands	多态性比率(%) Polymorphism ratio
E-AAC/M-CAA	46	43	93.4
E-ACG/ M-CAA	27	23	85.1
E-ACC/ M-CAG	34	27	79.4
E-AGC/ M-CAG	40	34	85.0
E-AAG/ M-CAT	30	14	46.6
E-ACA/ M-CTC	40	31	77.5
E-ACT/ M-CTC	32	29	90.6
E-ACC/ M-CTC	25	16	64.0
E-AGG/ M-CTG	21	16	76.2
E-AGG/ M-CTG	21	23	71.8
E-AAG/ M-CTG	30	23	76.7
E-ACA/ M-CTG	34	23	76.6
E-ACA/ M-CTT	27	22	81.5
E-AGC/ M-CTT	44	41	93.2
总计 Total	548	428	78.1
平均 Average	34.3	26.7	78.1

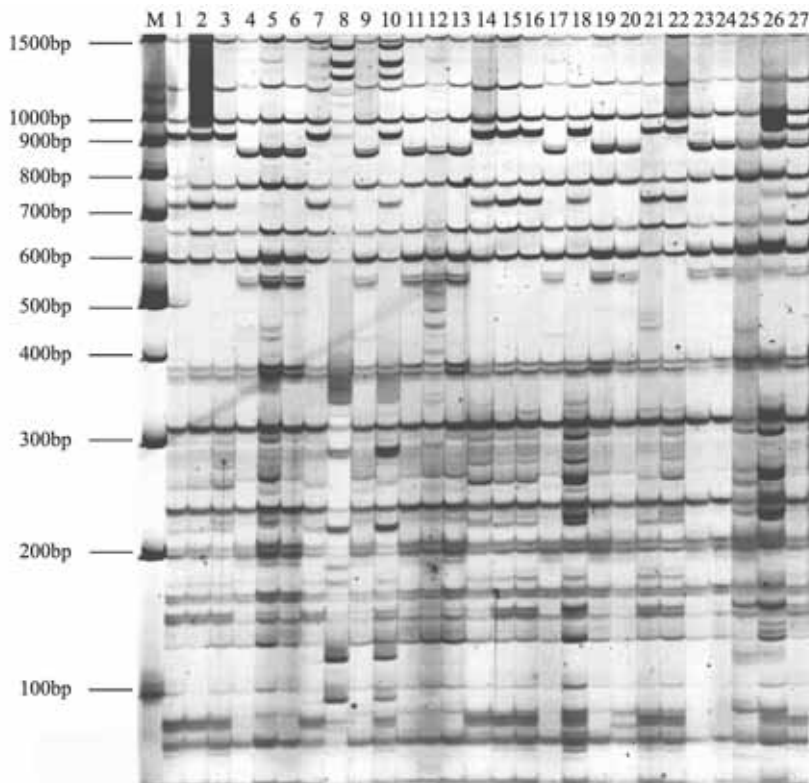


图 1 引物组合(E-ACG/ M-CAC)的 AFLP 图谱

从左至右依次是 100bp DNA Ladder 和 1~27 号样品

Fig. 1 AFLP fingerprints generated by the primer combination(E-ACG/ M-CAC)

From left to right are 100bp DNA Ladder and accessions 1~27 successively

表 3 不同样品间 AFLP 标记的遗传距离

Table 3 Genetic distance matrix between accessions of the *Gastrodia elata* B1 from different geographical regions based on AFLP information

No. of accessions	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15	16	17	18	19	20	21	22	23	24	25	26	27
1	***																										
2	0.0454	***																									
3	0.0708	0.0748	***																								
4	0.3020	0.2676	0.2508	***																							
5	0.1644	0.1820	0.1709	0.4185	***																						
6	0.5158	0.5282	0.5127	0.4763	0.3665	***																					
7	0.1579	0.1797	0.1514	0.3826	0.1072	0.3963	***																				
8	0.3772	0.3506	0.3324	0.1666	0.4853	0.5930	0.4412	***																			
9	0.2871	0.2532	0.2460	0.0493	0.4073	0.4883	0.3881	0.1450	***																		
10	0.0649	0.0889	0.0748	0.2970	0.1557	0.5096	0.1535	0.3612	0.2822	***																	
11	0.0531	0.0689	0.0590	0.2920	0.1644	0.5345	0.1535	0.3772	0.2920	0.0338	***																
12	0.0669	0.0828	0.0689	0.2846	0.1450	0.4883	0.1301	0.3480	0.2846	0.0434	0.0358	***															
13	0.2676	0.2390	0.2366	0.0610	0.4018	0.4528	0.3718	0.1666	0.0570	0.2724	0.2773	0.2603	***														
14	0.0728	0.0808	0.0788	0.2970	0.1600	0.4853	0.1450	0.3665	0.2871	0.0610	0.0493	0.0396	0.2676	***													
15	0.3772	0.3402	0.3428	0.1113	0.4974	0.5863	0.4823	0.2273	0.1196	0.3612	0.3772	0.3692	0.1407	0.3665	***												
16	0.1093	0.1217	0.1155	0.2920	0.2044	0.4441	0.1842	0.3612	0.2676	0.1093	0.1134	0.1031	0.2437	0.0970	0.3718	***											
17	0.0889	0.0970	0.0868	0.3070	0.1864	0.5408	0.1709	0.3990	0.3070	0.0689	0.0610	0.0669	0.2970	0.0768	0.3881	0.1217	***										
18	0.1976	0.1842	0.1600	0.1428	0.2920	0.5568	0.2700	0.2579	0.1514	0.1753	0.1666	0.1644	0.1644	0.1644	0.1644	0.1644	0.1644	***									
19	0.1622	0.1535	0.1343	0.1687	0.2724	0.5698	0.2508	0.2724	0.1687	0.1450	0.1196	0.1428	0.1775	0.1450	0.2532	0.2021	0.1579	0.0570	***								
20	0.0493	0.0531	0.0512	0.2773	0.1600	0.5158	0.1535	0.3665	0.2822	0.0493	0.0377	0.0473	0.2724	0.0570	0.3665	0.1052	0.0649	0.1622	0.1364	***							
21	0.3196	0.2797	0.2676	0.0512	0.4326	0.4974	0.4018	0.1909	0.0629	0.3095	0.3095	0.3020	0.0788	0.3095	0.1217	0.2995	0.3045	0.1450	0.1842	0.3045	***						
22	0.3196	0.2748	0.2676	0.0590	0.4383	0.5158	0.4073	0.1909	0.0590	0.3095	0.3095	0.3020	0.0788	0.3095	0.1176	0.3045	0.3196	0.1492	0.1842	0.3045	0.0187	***					
23	0.0512	0.0708	0.0377	0.2748	0.1622	0.5065	0.1428	0.3585	0.2700	0.0512	0.0319	0.0454	0.2651	0.0590	0.3692	0.1072	0.0629	0.1514	0.1093	0.0396	0.2970	0.2970	***				
24	0.0590	0.0629	0.0338	0.2603	0.1579	0.4883	0.1428	0.3324	0.2555	0.0512	0.0434	0.0454	0.2366	0.0590	0.3532	0.0990	0.0708	0.1471	0.1259	0.0434	0.2724	0.2724	0.0224	***			
25	0.0512	0.0629	0.0493	0.2700	0.1492	0.4883	0.1428	0.3376	0.2603	0.0434	0.0473	0.0415	0.2413	0.0551	0.3638	0.0868	0.0669	0.1514	0.1386	0.0319	0.2871	0.2871	0.0338	0.0224	***		
26	0.2627	0.2250	0.2555	0.0649	0.3963	0.4883	0.3826	0.1886	0.0649	0.2627	0.2579	0.2603	0.0689	0.2627	0.1407	0.2627	0.2920	0.1428	0.1428	0.2532	0.0708	0.0708	0.2651	0.2460	0.2366	***	
27	0.3120	0.2773	0.2797	0.0689	0.4470	0.5314	0.4213	0.1976	0.0570	0.3120	0.3120	0.3045	0.0889	0.3070	0.1364	0.3070	0.3222	0.1687	0.1775	0.3070	0.0629	0.0551	0.2995	0.2846	0.2895	0.0493	***

表中数据以小数点对齐



遗传距离最大的是大方(6号)与施秉(8号)之间为0.593,遗传距离最小的是桐梓(11号)与梵净山(10号)之间为0.0338,这表明原产贵州的天麻蕴藏较为丰富的基因资源。此外,贵州桐梓样品(11号)、正安样品(12号)和绥阳样品(14号)也表现出较小的遗传差异,遗传距离分别是0.0358(11号与12号)、0.0396(12号与14号)和0.0493(11号与14号),桐梓、正安和绥阳同处贵州的北部,这种较小的遗传差异也许与地理距离较近,生态环境与气候相近有关。与贵州相邻的四川天麻样品中,遗传差异最大的是青川样品(16号)与平武样品(18号)之间遗传距离为0.2158,遗传距离最小的为0.0570(18号与19号),说明遗传差异不大。不同省区样品间的遗传距离比较,贵州大方(6号)与四川平武(19号)的遗传距离为0.5698,比大方样品(6号)与贵州样品(8号)(0.593)的小,这似乎表明遗传差异的大小不完全与地理距离成正相关。

天麻的几个变型从表型上仅仅是花茎和小花颜色的差异。为了探明天麻变型是否是从分子水平上发生变异,对来自同一分布区天麻不同变型的遗传差异进行了分析,除来自大方的红天麻(4号)、乌天麻(5号)和绿天麻(6号)之间表现较大差异外(GD:0.3665~0.4763),云南昭通的3个变型(23号、24号、25号)、四川平武的两个变型(18号、19号)以及辽宁宽甸的两个变型(26号、27号),遗传距离在0.0224~0.0570之间,表现出较小的遗传差异,这表明分类学上的几种变型仅仅是表型上的变异,从分子水平上没有发生根本变异。这可能是同一基因型由于环境条件的改变在表型上发生的变化,即所谓的环境饰变(environmental modification)<sup>[12]</sup>。

### 2.3 不同分布区天麻的 UPGMA 聚类分析

聚类分析显示(图2),以相似性系数值约0.75为域值,所有样品可分成3类。第Ⅰ类包括峨眉(20号)到雷公山(7号)共17个样品,四川和云南的所有样品以及部分贵州的样品被归到第Ⅰ类。贵州的5个样品(4号、8号、9号、13号、15号)和陕西、辽宁的样品共9个归在第Ⅱ类。贵州大方(6号)构成第Ⅲ类。以相似性系数大约0.85为域值,所有的样品分为V类。第Ⅰ类包括贵州的7个样品(1号、2号、3号、10号、11号、12号、14号)和四川的所有5个样品以及云南昭通的3个样品。与遗传差异分析一致的是贵州北部的6个样品(1号、2

号、3号、11号、12号、14号)显示出较近的亲源关系。贵州的5号和7号构成第Ⅱ类。贵州中西部的4个样品(4号、9号、13号、15号)与地理距离相差很远的陕西和辽宁的样品构成第Ⅲ类。贵州施秉(8号)和贵州大方(6号)各成一类。有趣的是,贵州的6号样品与其余所有样品中的26个有较明显的差异,表现较大的遗传差异,这也许与该样品的基因发生突变有关。从聚类分析看,不同分布区天麻的亲源关系远近在一定的范围内呈现一定的地域相关性,如来自贵州北部几个地区的样本(梵净山、桐梓、正安、绥阳)遗传距离与地理距离就有一定的相关性( $r=0.7209$ ;  $p=0.04 < 0.05$ )。但在大的范围内并不具有明显的地域相关性。

为了解不同分布区天麻的遗传距离与地理距离之间是否存在内在关联,将所有样品的相似系数矩阵和直线地理距离进行 Mantel 相关性分析,结果未达到显著水平( $r=0.0045$ ,  $p=0.549$ )。这一结果可能与贵州样品组合间的遗传距离相对较大,而其他地区的样品组合间差异较小,或与样品个体间基因交流有限有关。

## 3 讨论

自 AFLP 技术发明以来,由于 AFLP 分子标记具有多态性检出率高、重复性好的特点,有助于植物种内遗传差异的全面综合评价,因此已在植物种内不同品种间、不同地理分布以及不同居群的遗传多样性分析中发挥了重要作用。天麻是我国重要的中药材,在我国有较广泛的分布。迄今为止,有关天麻资源多样性的全面综合评价工作开展不多,基础研究相对薄弱,这极大地制约了天麻种质资源的合理利用、遗传改良和保护工作。本研究从贵州、四川、云南、陕西、辽宁收集了27份天麻资源,对不同分布区的天麻进行遗传多样性评价。通过 AFLP 分析显示,16对 AFLP 引物组合对27份样品扩增出428条多态性带,多态性百分比达78%,多态性高于贵州野生天麻的多态性<sup>[8]</sup>,说明用 AFLP 标记进行天麻遗传多样性的分析以及构建天麻的分子指纹图谱是可行的。对天麻遗传差异的分析表明,27个样品间遗传距离在0.593~0.0187之间,这表明不同分布区的天麻虽然具有一定遗传多样性但较为有限。这也许是由于自然状态下天麻的有性繁殖因种子无胚乳很难萌发,需要专门的萌发菌提供营养<sup>[13]</sup>,以致天麻的个体间基因交流有限,而多代的无性繁殖方式导致天麻种质资源退化,使得天麻遗传多样性流

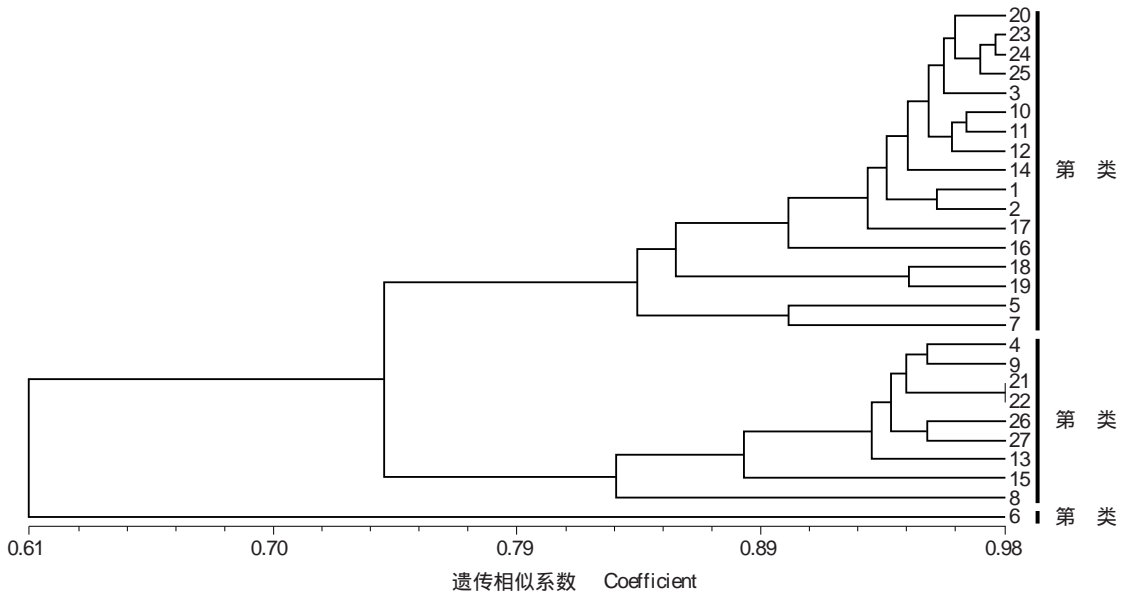


图 2 不同分布区天麻的 UPGMA 聚类图

Fig. 2 The UPGMA dendrogram of *Gastrodia elata* B1 accessions from different regions

失,遗传单一。加上长期以来对野生天麻的过度挖掘,使天麻野生资源濒于灭绝,这样也导致了遗传多样性降低。在分析的样品中,来源贵州的样品遗传距离(0.0338~0.5930)的差异相对较大,特别是贵州大方的样本表现出较明显的遗传差异,该结果与笔者对贵州天麻不同居群的 ISSR 分析结果(平均  $GD = 0.17$ 、 $PP = 80.8\%$ )基本一致<sup>[14]</sup>。从本研究的结果看,贵州天麻资源的遗传多样性较为丰富,分析原因可能有以下:(1)天麻在贵州分布较广,全省具有从南亚热带到中温带的 5 种气候类型<sup>[15]</sup>,因而其生活的环境也有较大的差异,而长期适应不同的生存环境,也可能导致遗传的变异。(2)贵州属于经济欠发达地区,自然环境受人为活动的干扰相对较小,天麻的自然资源相对丰富。(3)从样本的采集范围和数量来看,来自贵州的样本分布范围和数量比其余省份的广和多,故分析结果显示贵州的遗传多样性较来自其他几个省份的更为丰富。

从地理距离与遗传距离的相关性来看,许多研究都表明物种的遗传差异与地理分布具有相关性<sup>[16]</sup>。但也有报道发现,物种的遗传距离与地理分布并不呈显著的相关性<sup>[17-18]</sup>。AFLP 分子标记对不同分布区天麻的聚类结果以及遗传距离和地理距离相关性分析显示,尽管在一定区域范围内呈现出亲缘关系和遗传差异的地域趋势。但总的来看,亲缘关系和遗传距离与地理距离的远近没有明显的必然联系。Fischer 等<sup>[17]</sup>认为,只有在基因流动(gene

flow)起主导作用时,遗传距离和地理距离才会出现相关性,当遗传群体太小而产生遗传漂移(genetic drift)时,二者的相关性就不显著。按这一观点,推测长期以来天麻的野生资源由于人为的过度挖掘而成零散分布,群体的个体数量很小,同时天麻分布区之间的相互引种,可能造成研究结果中天麻的遗传距离和亲缘关系无明显的地域相关性。

我国学者根据天麻花茎颜色差异,在分类学上将天麻的种内变异定为几种变型,即红天麻(*Gastrodia elata* B1. f. *elata*)、乌天麻(*Gastrodia elata* B1. f. *glauca*. S. Chow)、绿天麻(*Gastrodia elata* B1. f. *viridis* Makino)和黄天麻(*Gastrodia elata* B1. f. *flavida* S. Chow)<sup>[19-20]</sup>。由于这几种变异性状不稳定,潘瑞乐等<sup>[21]</sup>、陈文强等<sup>[22]</sup>分别用酯酶同工酶(isozymes)和过氧化物酶(peroxidase isozymes)对天麻的几个变型进行分析,结果显示几种变型的酯酶同工酶谱带很相似,说明天麻种内变异在表型和遗传上存在一定可塑性。而过氧化物同工酶的谱带却反映出不同变型的差异。AFLP 的遗传差异和 AFLP 指纹图谱都显示,天麻种内的几个变型差异很小,除贵州大方的几个变型差异较大外,其余来自相同分布区的不同变型间差异都很小。这印证了酯酶同工酶的结果,说明天麻的种内变异仅仅是表型上的饰变,分子水平上没有发生根本变异,这种变异不稳定,可以因环境条件的变化而发生变化。分类学上对种内变型的变异性在何种程度上才能确认,目前还没有明确

标准,本研究的结果也表明天麻种内的表型变异尚未在遗传上固定下来,对天麻几个变型的划分是否成立还有待进一步研究。

本研究利用 AFLP 分子标记在一定程度上有效地揭示天麻的遗传多样性。物种的遗传多样性是人们保护物种和合理利用物种资源的基础<sup>[23-24]</sup>。为了更合理地利用和保护中国的这一传统中药资源,今后还需要更广泛的分析不同分布区天麻的遗传多样性特别是野生资源的遗传多样性,把分子水平、有效成分分析以及生态环境三方面结合起来全面综合的评价天麻遗传多样性<sup>[25]</sup>。此外,为了丰富天麻资源的遗传多样性,在天麻繁殖中建议采用种子繁殖,栽培中建议采用仿天麻原生态环境的栽培方式。

#### 参考文献

- [1] Kusan S. *Gastrodia elata* and its symbiotic association with *Armillaria mellea* [J]. coll Agric Imp Univ ToKyo, 1911, 4(1):1
- [2] 周铨,杨兴华,梁汉兴,等. 天麻形态学[M]. 北京:科学出版社,1987:41-73
- [3] 中国科学院植物研究所. 中国高等植物图鉴:第五册[M]. 北京:科学出版社,2002:657
- [4] 杜贵友,陈楷,周文全,等. 天麻促智冲剂治疗老年血管性痴呆临床观察[J]. 中国中药杂志,1998,23(11):695
- [5] 黄俊华,黄桂莲. 天麻注射液及天麻甙药理作用的初步研究[J]. 中国医学科学院学报,1985,7(5):399
- [6] Vos P R, Hogers M. AFLP: a new technique for DNA fingerprinting[J]. *Neu Res*, 1995, 23:4407-4414
- [7] 程纪伦,范爱辉,苟占平,等. 贵州野生天麻遗传多样性的 AFLP 指纹分析[J]. 时珍国医国药,2009,20(11):2866-2868
- [8] 谢渊,张小蕾,李毅,等. AFLP 技术在天麻遗传变异研究中的初步应用[J]. 植物生理学通讯,2007,49(1):141-144
- [9] 关萍,康冀川. 兰科植物天麻基因组 DNA 提取方法的比较研究[J]. 山地农业生物学报,2004,23(5):422-425
- [10] 邹喻苹,葛颂,王晓东. 系统与进化植物学中的分子标记[M]. 北京:科学出版社,2001:173-179
- [11] Nei M, Li W H. Mathematical model for studying genetic variation in terms of restriction endonucleases[J]. *Proceed Nat Acad Sci U S A*, 1979, 76:5269-5273
- [12] Macdonald S E. Evolution of phenotypic plasticity in the *stellaria longipes* complex: comparison among cytotypes and habitats [J]. *Evol*, 1988, 42(5):1038-1046
- [13] 徐锦堂,郭顺星,范黎,等. 天麻种子与小菇属植物真菌共萌发研究[J]. 菌物系统,2001,20(1):137-141
- [14] 关萍,马丹炜,王贵侠,等. 利用 ISSR 标记对天麻的贵州种群遗传多样性分析[J]. 北京林业大学学报,2007,29(6):35-40
- [15] 吴俊铭,帅世殊,杨静. 论贵州气候资源与农业结构调整[J]. 贵州农业科学,2004,32(2):67-69
- [16] Li Q, Xiao M M, Guo L, et al. Genetic diversity and genetic structure of endangered species *Trillium tschonoskii* [J]. *Biochem Genet*, 2005, 43:445-457
- [17] Fischer M, Husi R, Prati D, et al. RAPD variation among and within small and large population of the rare clonal plant *Ranunculus reptans* (*Ranunculaceae*) [J]. *Am J Bot*, 2000, 87(8):1128-1137
- [18] 于萍,李丽,侯丽媛,等. 太湖粳稻同名地方品种的遗传差异[J]. 植物遗传资源学报,2010,11(5):535-539
- [19] 周铨,陈心启. 国产天麻属植物的整理[J]. 云南植物研究,1983,5(4):361
- [20] 陈谦海,何顺志,熊源新,等. 贵州植物志:第十卷[M]. 贵阳:贵州科技出版社,2005:404
- [21] 潘瑞乐,徐锦堂. 天麻种内变异不同类型的酯酶同工酶研究[J]. 中国中药杂志,1996,21(2):84-86
- [22] 陈文强,邓百万,丁锐,等. 天麻 3 种变型过氧化物酶的同工酶研究[J]. 西北植物学报,2005,25(8):1665-1668
- [23] 胡尊红,郭鸿彦,胡学礼,等. 大麻品种遗传多样性的 AFLP 分析[J]. 植物遗传资源学报,2012,13(4):555-561
- [24] 李凤鸣,张华新,杨秀艳. 省沽油群体遗传多样性的 AFLP 分析[J]. 植物遗传资源学报,2012,13(1):130-133
- [25] 李明,高宝嘉,张静洁. 承德光秃山不同海拔油松居群遗传多样性与生境因子关联研究. [J]. 植物遗传资源学报,2012,13(3):350-356